

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 18 SEP 2000	
WIPO	PCT

#7
1-203

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

EP 00/06853

Aktenzeichen: 199 34 168.0

Anmeldetag: 21. Juli 1999

Anmelder/Inhaber: KD Pharma Bexbach GmbH, Bexbach/DE

Bezeichnung: Säulenchromatographisches Trennverfahren im
Rahmen einer Flüssigkeitschromatographie mittels
niedermolekularen Eluenten

IPC: B 01 D, C 07 C, C 07 B

4

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 28. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoiß

Beschreibung

Säulenchromatographisches Trennverfahren im Rahmen einer
Flüssigkeitschromatographie mittels niedermolekularen Eluenten

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein säulenchromatographisches Trennverfahren
im Rahmen einer Flüssigkeitschromatographie mittels Eluenten als mobile Phase
enthaltend niedere Moleküle, vorzugsweise Kohlendioxid, zur Isolierung und/oder
Reinigung und/oder präparativen Gewinnung von (Natur)Stoffen aus
10 (Natur)Stoffgemischen.

10

Säulenchromatographische Trennverfahren spielen vermehrt in der Rohstoff-
Aufbereitung, in der Produktreinigung, in der chemischen Synthese sowohl im
Laboratoriumsmaßstab wie auch bei großtechnischen Produktionen eine
15 bedeutende, hier nicht weiter zu betonende Rolle. Ebenfalls in der chemischen
Analytik sind sie für die Isolierung, Identifikation und quantitativer / qualitativer
Bestimmung einzelner Komponenten in Substanzgemischen unentbehrlich. Weitere
wichtige Anwendungsgebiete für derartige Trennungen sind das Recycling, wobei
aus Altmaterialien, wie Abwasser und Abgasen Gifte und Schadstoffe, aber auch
20 Wertstoffe abgeschieden werden.

20

Aus Kostengründen haben es bisher jedoch nur wenige säulenchromatographische
Trennverfahren bis zur kommerziellen Nutzung gebracht. Insbesondere im Rahmen
der präparativen Rohstoffgewinnung, insbesondere aus Naturstoffgemischen -
25 sowie deren Analytik - sind relevant die säulenchromatographischen Trennverfahren
der HPLC ("High Performance Liquid Chromatography" oder Hochleistungs-
(Hochdruck-)Flüssigkeitschromatographie) sowie die SFC ("Supercritical Fluid
Chromatographie"), sogenannte Flüssigkeitschromatographie mit überkritischen
Gasen (Fluiden).

25

30

Die HPLC macht sich die Erkenntnis zunutze, daß die Trennleistung einer Säule mit
abnehmender Korngröße der stationären Phase zunimmt. Bei der HPLC wird mit

erheblich feinerem chromatographischen Trennmaterial (3–10 µm) als bei der Gelchromatographie (35–75 µm) oder der "klassischen" Säulenchromatographie (120–200 µm) gearbeitet. Die Feinteiligkeit der Trennmaterialien erfordert allerdings die Anwendung hoher Drücke (bis zu 40 MPa), dies ist mit erheblichem technischen Aufwand verbunden. Die Säulen sind zwischen 5 - 100 cm (zumeist jedoch bis 25 cm) lang mit einem Innendurchmesser von 1–25 mm. Mit Kieselgel oder ähnlich porösem Material (von 10 µm oder weniger) gefüllt, kann eine 25 cm lange Säule 5000 Böden (theoretische Trennstufen) aufweisen – selbst Bodenzahlen von 65000/m können je nach stationärer Phase erzielt werden. Typische HPLC-Trennungen werden im Bereich der Raumtemperatur durchgeführt (Vgl. Fa. Merck, Chrombook, 1996, Darmstadt, Fa. Phenomenex, Chromatographiekatalog, 99/00, Torrance, CA, USA). Die notwendigen Pumpen können in der analytischen HPLC bis zu einem Druck von 400 bar betrieben werden. In der präparativen HPLC werden Pumpen betrieben bis zu einem Druck von 70 (Pumpenleistung: 300 l/h) bis 100 bar (Pumpenleistung: 60 l/h Eluent (Flüssigkeit)) (vgl. z.B. Fa. Merck, Chrombook, S. 233, 1996, Darmstadt). Der limitierende Faktor bei der HPLC ist, insbesondere bei hohen Flüssen, der Pumpendruck. Die verwendeten Säulenlängen sind daher zumeist kurz; es gilt: Je kleiner der Teilchendurchmesser des verwendeten chromatographischen Materials, desto kürzer müssen die Säulen werden. Prinzipiell kann eine Kompensation durch höhere maximale Arbeitsdrücke erfolgen, dies erhöht jedoch die Betriebskosten enorm und führt das HPLC - Verfahren im Rahmen einer präparativen Anwendung in die Unwirtschaftlichkeit.

Die SFC hat sich als säulenchromatographisches Trennverfahren mit Gasen (CO₂, N₂O, SF₆ etc.) im überkritischen Zustand als mobile Phase durchgesetzt. Bei der SFC werden Flüssigkeiten und Gase unter Druck erhitzt, wobei diese oberhalb der jeweiligen kritischen Temperatur und des kritischen Drucks in den überkritischen Zustand überführt werden. In diesem Zustand zeichnen sich überkritische Flüssigkeiten gegenüber echten Flüssigkeiten nicht nur durch ihre geringere Dichte, viel niedrigere Viskosität und viel höhere Diffusionskoeffizienten aus, sondern vor allem durch ihr hervorragendes Lösungsvermögen. Deshalb finden sog. verdichtete Gase aus CO₂ (ca. 40° C, 80–200 bar, siehe Fig. 5), Ethylen, Propan, Ammoniak,

Distickstoffdioxid, Stickstoffheterocyclen u. a. Anwendung in der Extraktion - sog. Supercritical Fluid Extraction (SFE od. SCFE; dt. "Destraktion") - von Naturstoff n (bekannt ist z. B. Coffein aus Kaffee durch überkritisches CO₂, von Hopfenbitterstoffen, Riechstoffen), von Kohlenwasserstoffen aus Erdöl oder Kohle, zur Reaktivierung von Heterogenkatalysatoren (Vgl. Wenclawiak (Hrsg.), Analysis with Supercritical Fluids: Extraction and Chromatography, Berlin: Springer 1992).

In der Regel wird in der SFC bei Temperaturen über 35°C und einem Druck auf der Säulenauslaßseite von über 120 bar gearbeitet.

10

Beschrieben sind zahlreiche Trennungen bei Temperaturen unterhalb der kritischen Temperatur der verwendeten mobilen Phase; vgl. K. Anton, C. Berger (Ed.); Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hongkong, 1998.

15

Vérillon und Coleman beschreiben auf Seite 64 (Anton supra) den Temperatur- und Druckbereich für das Arbeiten mit Fluiden- wie CO₂ - zwischen 3 bis 200°C und 90 - 400 bar. Die Trennungen erfolgen im überkritischen und subkritischen Bereich, jedoch nicht im flüssigen Bereich, d.h in einem Druckbereich unter dem kritischen Druck und Temperatur.

20

Jusforques beschreibt auf S. 409 in Kap. 14 (supra Anton) den erforderlichen Arbeitsbereich mit Temperaturen zwischen 0 und 150°C und Drücken zwischen 100 und 350 bar an (SFC-Apparatur: Super C12 im Rahmen einer präparativen SFC).

25

Die Firma Prochrom gibt ebenfalls einen Arbeitsdruckbereich zwischen 100 und 350 bar an, bei Temperaturen zwischen 10 und 80°C (Fa. Prochrom, Prospekt zu semi-preparative Supercritical Fluid Chromatograph, Type: SuperC 20, 1998, Chamigneulle, Frankreich).

30

EP 0 099 765 B1 offenbart, daß der Einlaßdruck des Gemisches in die Säule größer als der kritische Druck des Eluenten sein muß, und zwar zwischen 1,05 und 3.

Drücke kleiner als der kritische Druck werden ausdrücklich als Abscheidebedingungen beschrieben.

M. Perrut beschreibt in NO 163139 als Trennbedingungen nur den überkritischen und subkritischen Bereich und zwar Drücke von 70-250 bar und Temperaturen zwischen 25 und 80°C.

Im Stand der Technik sind keine säulenchromatographischen Trennungen im Rahmen einer Flüssigkeitschromatographie realisiert für Eluenten als mobile Phasen, mit einem Arbeitsbereich unter der kritischen Temperatur und Druck.

Schultz et. al (Schultz, W.G.; Randall, J.M.: Food Technol. 24, 1282 (1970)) beschreibt lediglich eine unspezifische Extraktion bei 22°C und 63 bar von Aromakonzentraten aus homogenisierten Früchten und Fruchtsäften. Eine chromatographische Trennung ist nicht erfolgt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein säulenchromatographisches Trennverfahren im Rahmen einer Flüssigkeitschromatographie für die großtechnische Isolierung und/oder Reinigung und/oder präparative Gewinnung von (Natur)Stoffen aus (Natur)Stoffgemischen bereitzustellen, das aufgrund einer hohen Trennleistung zu reinen Produkten führt.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung und/oder präparative Gewinnung von (Natur)Stoffen aus Stoffgemischen mittels eines säulenchromatographischen Verfahrens, dadurch gekennzeichnet, daß der Eluent niedrigere Moleküle enthält (nachstehend erfindungsgemäßes Verfahren).

Eine weitere Aufgabe ist die Bereitstellung einer Apparatur oder Anordnung, die das erfindungsgemäße Verfahren geeignet umsetzt.

Im Sinne dieser Erfindung sind Eluenten niedrigerer Moleküle solche leichtflüchtige – mit geringer Wechselwirkung - wie Distickstoffoxid (N_2O); Freone wie z.B.

Chlortrifluormethan (CClF_3), Trifluormethan (CHF_3), Tetrafluormethan (CF_4), 1,1,1,2-tetrafluorethan ($\text{C}_2\text{F}_4\text{H}_2$); Kohlendioxid (CO_2), Schwefelhexafluorid (SF_6), Propen (C_3H_6), Propan (C_3H_8), Ammoniak (NH_3), Schwefeldioxid (SO_2), Xenon (Xe), Ethan (C_2H_6), welche bei Normalbedingungen gasförmig vorliegen. Vorzugsweise werden
5 solche Eluenten eingesetzt, die eine dynamische Viskosität von $10^{-4} - 10^{-5} \text{ Pa s}$, vorzugsweise $2 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-5} \text{ Pa s}$ eine Dichte von $0,5 - 1,2 \text{ g/ml}$, vorzugsweise $0,5 - 1,2 \text{ g/ml}$ aufweisen. Im erfindungsgemäßen Verfahren liegen solche niedere Moleküle als Eluent in der mobilen Phasen flüssig vor. Es werden vorzugsweise solche Eluenten eingesetzt, die dem Fachmann auf dem Gebiet der SFC bekannt
10 sind. Flüssiges Kohlendioxid ist jedoch ganz besonders bevorzugt und zwar in einem Druckbereich von 5,2 bis 73,7 bar, vorzugsweise von 30 bis 60 bar - und einem Temperaturbereich von -57°C bis $31,3^\circ\text{C}$, vorzugsweise von 0 bis 20°C .

Selbstverständlich können die genannten Eluenten auch in einer Mischung
15 vorliegen.

Der Arbeitsbereich des eingesetzten niedermolekularen Eluenten ist die flüssige Phase mit den zugehörigen p,T-Werten, wie in Figur 5 im Fall des CO_2 markiert. Diese p,T - Werte herrschen ebenfalls an der gewählten chromatographischen
20 Trennsäule über welche der Eluent als mobile Phase geführt wird.

Säulenchromatographisches Trennverfahren im Sinne dieser Erfindung bedeutet, daß eine Stofftrennung durch Verteilung (Die Stofftrennung wird durch den Lösevorgang in beiden, miteinander nicht mischbaren Phasen bestimmt) und
25 Adsorption - an einem Feststoff (Adsorbens) - an einer stationären Phase in Gegenwart eines Eluenten als mobile Phase erfolgt. Insofern kann von einer Flüssig-fest-Chromatographie (engl. Liquid-Solid Chromatography, LSC) gesprochen werden. Zu den hier benutzten Begriffen existieren Terminologie-Vorschläge der IUPAC, auf diese wird sich ausdrücklich bezogen.

30 In einer besonderen Ausführungsform wird die mobile Phase, enthaltend ein Eluent, mit Hilfe eines in der Chromatographie üblichen Modifiers wie z.B. Ethanol,

Methanol, etc. versetzt. Dieser Modifier kann ggf. mit weiteren Hilf- und Zusatzstoffen, wie Säuren oder Basen (z.B. Essigsäure, Diethylamin) versetzt werden.

- 5 Es ergeben sich im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahren zahlreiche Vorteile:

Besonders vorteilhaft gegenüber dem Stand der Technik ist, daß im erfindungsgemäßen Verfahren lediglich Drücke bis ca. 70 bar notwendig sind, wodurch Kosten eingespart werden können, da alle benötigten Bauteile wie

10 Pumpen, Druckaufnehmer, Rohrleitungen etc. entsprechend ausgelegt bzw. kleiner dimensioniert werden können. Die erforderlichen Sicherheitsanforderungen zur Arbeitssicherheit und Betriebssicherheit können reduziert werden.

- Es wurde nunmehr in überraschender Weise gefunden, daß das erfindungsgemäße
- 15 Verfahren in Gegenwart jedweder handelsüblicher fester stationärer Phasen erfolgen kann, wie sie im Rahmen der HPLC und/oder der SFC verwendet werden. Bevorzugt sind jedoch Säulen mit modifizierten oder unmodifizierten Phasen auf Basis von Kieselgel, Aluminiumoxid, Titandioxid etc. sowie polymere stationäre Phasen, wie z.B. Kieselgel, Diolphase auf Kieselgelbasis, Aminopropyl, RP8, RP18-
- 20 Phasen auf Kieselgelbasis

- Das erfindungsgemäße Verfahren kann für Säulenlängen in weiten Bereichen eingesetzt werden, mindestens 10 cm lang, bevorzugt sind jedoch Längen von 0,25 - 2,0 m, besonders bevorzugt ist 1,1 - 1,7 m. Diese höheren Säulenlängen
- 25 gewährleisten eine hohe Trennleistung und können erreicht werden, da das erfindungsgemäße Verfahren keinen großen Druckabfall in der Säule verursacht. Der Druckabfall kann nach Formel 1 an Tabelle 1 abgeschätzt werden. Da die Viskosität klein gewählt ist, ist auch der resultierende Druckabfall gering. Durch den geringen Druckabfall pro cm Säule kann die Säule bei gleichem
- 30 Teilchendurchmesser der stationären Phase entsprechend lang gewählt werden oder es können im Vergleich zur HPLC kleinere Teilchendurchmesser bei konstanter Säulenlänge verwendet werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft funktionale Anordnungen notwendiger Bauelemente zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

- 5 Zur weiteren Erläuterung der Erfindung ist in Figur 6 ein Schema/Fließdiagramm einer üblichen SFC-Anordnung im industriellen Maßstab gegeben (Eluent CO_2).

Einspeisendes CO_2 wird aus einem flüssig CO_2 -Vorratstank (1) mittels eines Wärmetauschers (2) abgekühlt. Das von der Pumpe (3) geförderte CO_2 wird mittels
10 des Wärmetauschers (4) auf überkritische Bedingungen gebracht ($T > 31^\circ\text{C}$, $p > 74\text{bar}$), typischerweise $40-60^\circ\text{C}$. Jenes CO_2 strömt durch die Trennsäule (7) und wird am Druckregelventil (9) entspannt. Dieses Druckregelventil (9) regelt den Säulenauslaßdruck, der am Ende der Trennsäule (7) herrscht und über dem kritischen Druck gehalten ($p > 74\text{bar}$) wird. Dadurch werden in der Trennsäule (7)
15 überkritische Trennbedingungen gewährleistet. Das CO_2 kühlt sich durch die adiabatische Expansion am Druckregelventil (9) ab. Anschließend wird das CO_2 mit Wärmetauscher (14) aufgeheizt und in den gasförmigen Zustand gebracht. Im Abscheider (11) wird das Produkt vom gasförmigen CO_2 getrennt. Das gasförmige CO_2 gelangt über den Wärmetauscher (13), der es wieder verflüssigt, in den
20 Vorratstank (1). Es ergibt sich ein geschlossener CO_2 -Kreislauf. Das Produkt wird aus dem Vorratsgefäß (6) mit Hilfe der Pumpe (5) diskontinuierlich auf die Trennsäule (7) injiziert.

Für diese übliche SFC-Anordnung sind energieintensiv total mindestens vier
25 Wärmetauscher notwendig.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahren ergeben sich zusätzlich zu Figur 6 zahlreiche Möglichkeiten einer funktionale Anordnung von denen einige in den Figuren 7-9 dargestellt werden.

30

Der besondere Vorteil liegt darin, daß ein energieaufwendiges wechselndes Abkühlen und Erhitzen des CO_2 vermieden wird.

Figur 7: Einspeisendes CO₂ wird aus einem flüssig CO₂-Vorratstank (1) mittels eines Wärmetauschers (2) abgekühlt. Das von der Pumpe (3) geförderte CO₂ wird mittels des Wärmetauschers (4) auf die Trenntemperatur eingestellt. Dieser kann j doch sehr klein sein, da das CO₂ nur von typischerweise 0-5°C auf 5-20°C erwärmt wird.

5 Werden niedrige Trenntemperaturen, z.B. 5°C, gewählt, so kann zudem Wärmetauscher (4) außer Betrieb genommen werden. Das flüssige CO₂ strömt durch die Trennsäule (7). Mit Hilfe eines Umschaltventiles werden die einzelnen Fraktionen auf sogenannte Fraktionierungssäulen (10) umgeleitet. In den Figuren 7-9 sind exemplarisch drei Fraktionierungssäulen (10a, 10b, 10c) dargestellt. Es sind
10 beliebig viele Fraktionierungssäulen möglich, im einfachsten Fall jedoch eine Fraktionierungssäule und eine zusätzliche Rohrleitung, welches das Umschaltventil (8) mit Umschaltventil (12) verbindet.

Der Säulenauslaßdruck wird mit Druckregelventil (9) geregelt. An diesem Ventil
15 erfolgt die Entspannung des CO₂. Nach Injektion der Probe (Annahme: die Probe enthält 3 Komponenten A, B und C) wird die Probe auf der Trennsäule (7) getrennt. Während der Elution von Komponente A wird Umschaltventil (8) so geschaltet, daß CO₂ und Komponente A in Richtung Umschaltventil (9a) umgeleitet wird. Das flüssige CO₂ wird entspannt. Das CO₂ verliert seine Lösungskraft. Komponente A
20 wird dadurch auf der Fraktionierungssäule (10a) festgehalten. Das CO₂ wird durch Wärmetauscher (13) weiter abgekühlt (falls notwendig) und gelangt wieder in Vorratstank (1).

Nach Elution von Komponente A von der Säule wird Umschaltventil (8) auf
25 Fraktionierungssäule (10b) umgeschaltet. Die eluierende Komponente B wird auf Fraktionierungssäule (10b) festgehalten. Komponente C auf Fraktionierungssäule (10c). Eluiert keine Probesubstanz kann wahlweise der CO₂-Strom über eine der Fraktionierungssäulen geführt werden oder eine zusätzliche Rohrleitung mit einem Druckregelventil, welches Umschaltventil (8) mit Umschaltventil (12) verbinden.

30

Das chromatographische Material der Trennsäule (7) ist so gewählt, daß die Auflösung der Probekomponenten maximal ist. Das Material der

Fraktionierungssäulen (10a-c) wird so gewählt, daß Adsorption der jeweiligen Probekomponente unter den dort herrschenden Bedingungen während der Trennung maximal ist.

- 5 Diese Vorgehensweise kann für mehrere Injektionen wiederholt werden (bis die Kapazität einer Fraktionierungssäule erreicht ist). Die Elution der jeweiligen Komponenten erfolgt mit einem geeigneten starken Lösemittel, z.B. Ethanol. Eine separate Pumpe fördert den Eluenten über Umschaltventil (8) bis zum Auslaß nach Umschaltventil (12). Die Wertfraktionen werden also in diesem Fall in Flüssigkeit
10 gelöst aufgefangen.

Der Vorteil dieser funktionalen Anordnung (Figur 7) liegt darin, daß weder ein Wärmetauscher (14) noch ein Abscheider (11) benötigt wird.

- 15 Figur 8 zeigt im Prinzip eine ähnliche Anordnung wie Figur 7. Als Änderung ist das Druckregelventil (9) direkt hinter der Trennsäule (7) angebracht. Das expandierte CO₂ mit der jeweiligen Probekomponente wird erst nach der Entspannung mittels des Umschaltventils (8) auf die Fraktionierungssäule (10a-c) geleitet. Der Vorteil gegenüber der Anordnung von Figur 6 ist, daß nur ein Druckregelventil (9) benötigt
20 wird.

Die Anordnung in Figur 9 unterscheidet sich von Figur 7 dadurch, daß die Druckregelventile (9a-c) hinter den Fraktionierungssäulen (10a-c) angebracht sind. Zusätzlich befinden sich dahinter zusätzliche Abscheider (11a-c).

- 25 Bei dieser Anordnung wird der Druck hinter der Fraktionierungssäule reguliert. Das Material der Fraktionierungssäule (10a-c) wird so gewählt, daß die Komponenten A, B und C bei den herrschenden Bedingungen in der Fraktionierungssäule (10a-c) zurückgehalten werden. Nach mehrmaliger Injektion und Sammeln der
30 Komponenten durch Erhöhung der Elutionsstärke des CO₂ und/oder Zusatz eines Modifiers zur Elution und über den jeweiligen Abscheider (11a-c) vom CO₂ getrennt werden. Alternativ kann auch die Elution mit einem flüssigen Eluenten erfolgen. In

diesem Fall können die Abscheider (11a-c) entfallen. Die Anordnung kann auch so abgewandelt werden, daß anstelle von drei Abscheidern (11a-c) nur ein Abscheider hinter dem Umschaltventil (12) verwendet wird.

5 Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann eine übliche SFC-Anlage energetisch viel günstiger betrieben werden. Im Wärmetauscher (4) muß das CO₂ überhaupt nicht oder nur wenig erwärmt werden. Durch den geringeren Druck vor der Druckregeleinheit (9) ist auch die Abkühlung durch die adiabatische Expansion geringer und damit muß dem Wärmetauscher (14) viel weniger Energie zugeführt werden. Prinzipiell kann das erfindungsgemäße Verfahren auf jeder SFC- Anlage
10 ausgeführt werden (siehe Beispiel 2, Figur 6, SFC-Anlage der KD-Pharma, Am Kraftwerk 4-6, D 66450 Bexbach).

Ein weiterer Erfindungsgegenstand betrifft daher eine funktionelle Anordnung
15 und/oder eine Vorrichtung bestehend mindestens aus einer Pumpe (3), Trennsäule (7), einem Wärmetauscher (13), einem Druckregelventil (9) und ggf. weitere Wärmetauscher - wie Wärmetauscher (4) - und Abscheider - wie Abscheider (11), wie in den Figuren 7-9 repräsentiert.

20 Das Verfahren ist ganz besonders geeignet zur säulenchromatographischen Trennung von ungesättigten Fettsäuren (siehe Beispiel 2), vorzugsweise aus Naturölen wie Pflanzenöl, Algenöl, Öl von Mikroorganismen oder Pilzen sowie Fischöl und somit zur Gewinnung und Reinigung von SDA (Stearidonsäure, 18:4, n-3), AA (Arachidonsäure, 20:4, n-6), ETA (Eicosatetraensäure, 20:4, n-3), EPA
25 (Eicosapentaensäure, 20:5, n-3), DPA (Docosapentaensäure, 22:5, n-3), DHA (Docosahexaensäure, 22:6, n-3). GLA (gamma-Linolensäure 18:3, n-6), ALA (alpha-Linolensäure 18:3, n-3), DPA (Docosapentaensäure, 22:5, n-6).

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung, ohne die
30 Erfindung auf diese Beispiele zu begrenzen.

Beispiele

Beispiel 1:

SFC-Anordnung gemäß Figur 6. Die verwendeten Säulen haben eine Länge von bis zu 170 cm. Die verwendeten Arbeitsdrücke betragen in der Regel zwischen 120 und 350 bar. Diese Säulen können in der SFC eingesetzt werden, da die Druckabfälle auch über einer so langen Säule nur gering sind (normalerweise 20-50 bar). Durch die geringen Druckabfälle können auch höhere Flüsse, die in der SFC im Gegensatz zur HPLC nur zu einem geringen Effizienzverlust führen, eingesetzt werden – vgl. Tabelle 1: (Eluent: Kohlendioxid)

Berechnung p	Säule:	L (cm)	d(cm)	r(cm)	Dp(μm)			
110		110	9	4,5	25			
	ρ (g/ml)	η dyn.(Pa s)	η dyn.(cPoise)	F (kg/h)	F (ml/min)		Δp (bar)	
80 bar, 50°C	0,219	2,05E-05	0,02053	300	22.831,05		21,6	SFC
100 bar, 50°C	0,3899	2,95E-05	0,02945	300	12.823,80		17,4	SFC
200 bar, 50°C	0,784	6,80E-05	0,06797	300	6.377,55		20,0	SFC
25°C, 150 bar	0,8771	8,63E-05	0,0863	300	5.700,60		22,7	SbSFC
0°C, 150 bar	1	1,23E-04	0,1234	300	5.000,00		28,4	SbSFC
0°C, 300 bar	1,055	1,47E-04	0,1466	300	4.739,34		32,0	SbSFC
0°C, 40 bar	0,9333	1,01E-04	0,1009	300	5.357,33		24,9	LFC
10°C, 50 bar	0,8705	8,00E-05	0,08	300	5.743,83		21,2	LFC
25°C, 70 bar	0,744	6,04E-05	0,06043	300	6.720,43		18,7	LFC
MeOH, 20°C	0,79	5,84E-04	0,584	300	6.329,11		170,4	HPLC
EtOH, 20°C	0,789	1,20E-03	1,201	300	6.337,14		350,9	HPLC

Berechnung gemäß:
$$\Delta p = \frac{F \cdot \eta \cdot L \cdot 1000}{60 \cdot \pi \cdot r^2 \cdot dp^2}$$

mit

- Δp Druckabfall in [bar]
 F Volumenfluß des Eluenten in [ml/min]
 L Länge der Säule in [cm]

erreichbare EPA-Reinheit ist auf dieser stationären Phase ca. 80%. Definiert man als Vergleich für die Massenausbeute eine EPA-Reinheit von mehr als 70% so ist die Ausbeute mit 36,2% bei flüssigen Bedingungen wesentlich höher als bei überkritischen Bedingungen mit nur 30,3%. Das stark ausgeprägte Tailing sowohl
5 der EPA als auch der DHA ist vermutlich auf noch hochaktive Silanolgruppen zurückzuführen. Diese Phase ist für die Trennung weniger geeignet. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß die Trennungen in verschiedenen Zustandsbereichen vergleichbar sind.

Beschreibung der Figuren:

Figur 1: Reinheit der erhaltenen Fraktion an EPA in %; Trennung eines Fischöls unter versch. Bed.: fl. Bed ($T=18^{\circ}\text{C}$, $p_n=52\text{ bar}$; $F=300\text{ kg/h}$); überkritische Bed.: ($T=46^{\circ}\text{C}$, $p_n=105\text{ bar}$; $F=300\text{ kg/h}$); Phase: Aminopropyl; mobile Phase: CO_2 .

Figur 2: Reinheit der erhaltenen Fraktion an EPA und DHA in %; Trennung eines Fischöls unter versch. Bed.: fl. Bed ($T=18^{\circ}\text{C}$, $p_n=52\text{ bar}$; $F=300\text{ kg/h}$); überkritische Bed.: ($T=46^{\circ}\text{C}$, $p_n=105\text{ bar}$; $F=300\text{ kg/h}$); Phase: Aminopropyl; mobile Phase: CO_2 .

Figur 3: Reinheit der erhaltenen Fraktion an EPA in %; Trennung eines Fischöls unter versch. Bed.: fl. Bed ($T=18^{\circ}\text{C}$, $p_n=52\text{ bar}$; $F=300\text{ kg/h}$); überkritische Bed.: ($T=46^{\circ}\text{C}$, $p_n=160\text{ bar}$; $F=300\text{ kg/h}$); Phase: Kieselgel; mobile Phase: CO_2 .

Figur 4: Reinheit der erhaltenen Fraktion an EPA und DHA in %; Trennung eines Fischöls unter versch. Bed.: fl. Bed ($T=18^{\circ}\text{C}$, $p_n=52\text{ bar}$; $F=300\text{ kg/h}$); überkritische Bed.: ($T=46^{\circ}\text{C}$, $p_n=160\text{ bar}$; $F=300\text{ kg/h}$); Phase: Kieselgel; mobile Phase: CO_2 .

Figur 5: Phasediagramm CO_2

Figur 6: Fließdiagramm üblicher SFC Anlage

Figur 7-9: Funktionelle Anordnungen

Im Text verwendete Abkürzungen:

HPLC Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

SFC Chromatographie mit überkritischem Gas

SbSFC Chromatographie mit subkritischem Gas ($T < T_{kr}$,
 $p > p_{kr}$)

LFC Chromatographie mit flüssigem Gas ($T < T_{kr}$, $p < p_{kr}$)

EPA Eicosapentaensäureethylester (20:5)

DHA Docosahexaensäure (22:6)

15



Patentansprüche

1. Verfahren zur säulenchromatographischen Trennung von Stoffgemischen, dadurch gekennzeichnet, daß der Eluent niedere Moleküle enthält.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Eluent Distickstoffoxid (N_2O); Freon wie z.B. Chlortrifluormethan (CClF_3), Trifluormethan (CHF_3), Tetrafluormethan (CF_4), 1,1,1,2-tetrafluorethan ($\text{C}_2\text{F}_4\text{H}_2$); Kohlendioxid (CO_2), Schwefelhexafluorid (SF_6), Propen (C_3H_6), Propan (C_3H_8), Ammoniak (NH_3), Schwefeldioxid (SO_2), Xenon (Xe), Ethan (C_2H_6) ist oder eine Mischung davon ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Eluent eine dynamische Viskosität von $10^{-4} - 10^{-5}$ Pa s, vorzugsweise $2 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-5}$ Pa s und eine Dichte von 0,5 – 1,2 g/ml, vorzugsweise 0,5 – 1,2 g/ml aufweist.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Eluent Kohlendioxid ist mit einem Druckbereich von 5,2 bis 73,7 bar, vorzugsweise von 30 bis 60 bar - und einem Temperaturbereich von -57°C bis $31,3^\circ\text{C}$, vorzugsweise von 0 bis 20°C .
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Eluent mindestens einen Modifier enthält und/oder ggf. weitere Zusatz- und Hilfsstoffe.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Säulenlänge mindestens 10 cm beträgt, vorzugsweise 0,25 – 2,0 m, besonders bevorzugt 1,1 – 1,7 m beträgt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Säule gepackt ist mit modifizierten oder unmodifizierten Phasen auf Basis

von Kieselgel, Aluminiumoxid, Titandioxid sowie polymere stationäre Phasen, wie Kieselgel, Diolphase auf Kieselgelbasis, Aminopropyl, RP8, RP18-Phasen auf Kieselgelbasis.

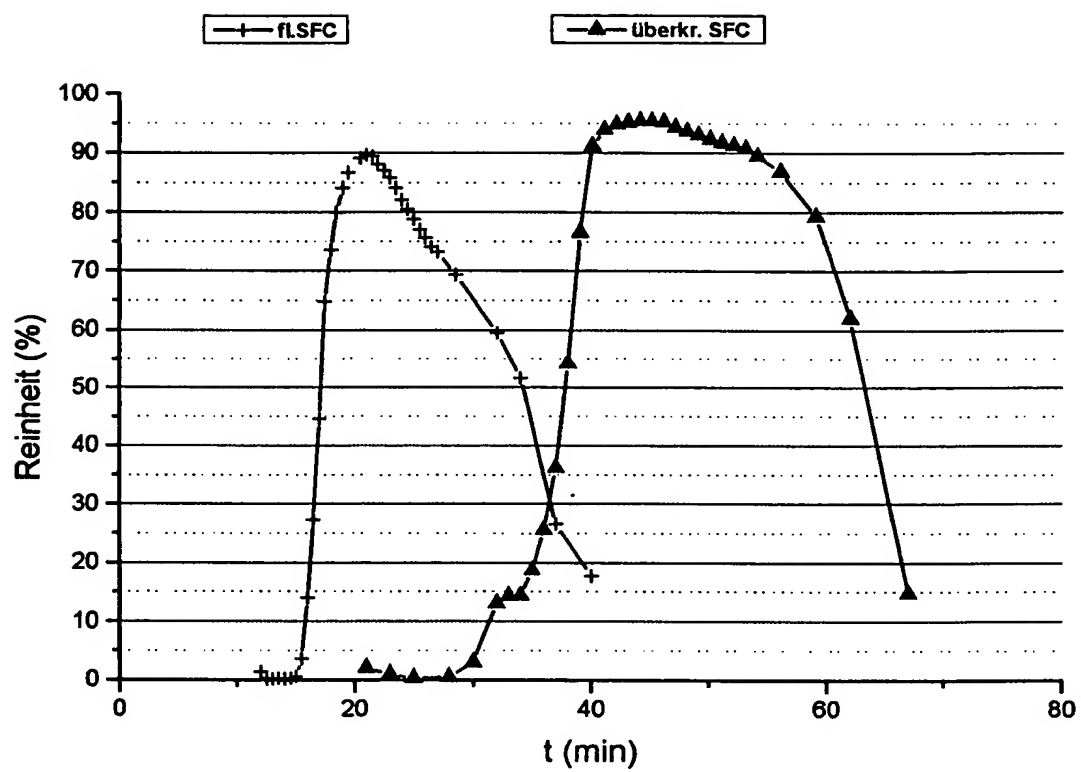
5 8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, zur Isolierung und/oder Reinigung und/oder präparativen Gewinnung, von ungesättigten Fettsäuren aus Naturölen.

9. Funktionelle Anordnung gemäß einer der Ansprüche 1 bis 7 bestehend mindestens aus einer Pumpe (3), Trennsäule (7), einem Wärmetauscher (13),
10 einem Druckregelventil (9) und ggf. weitere Wärmetauscher und Abscheider, wobei die Figuren 6-9 ausdrücklich Teil des Anspruchs sind.

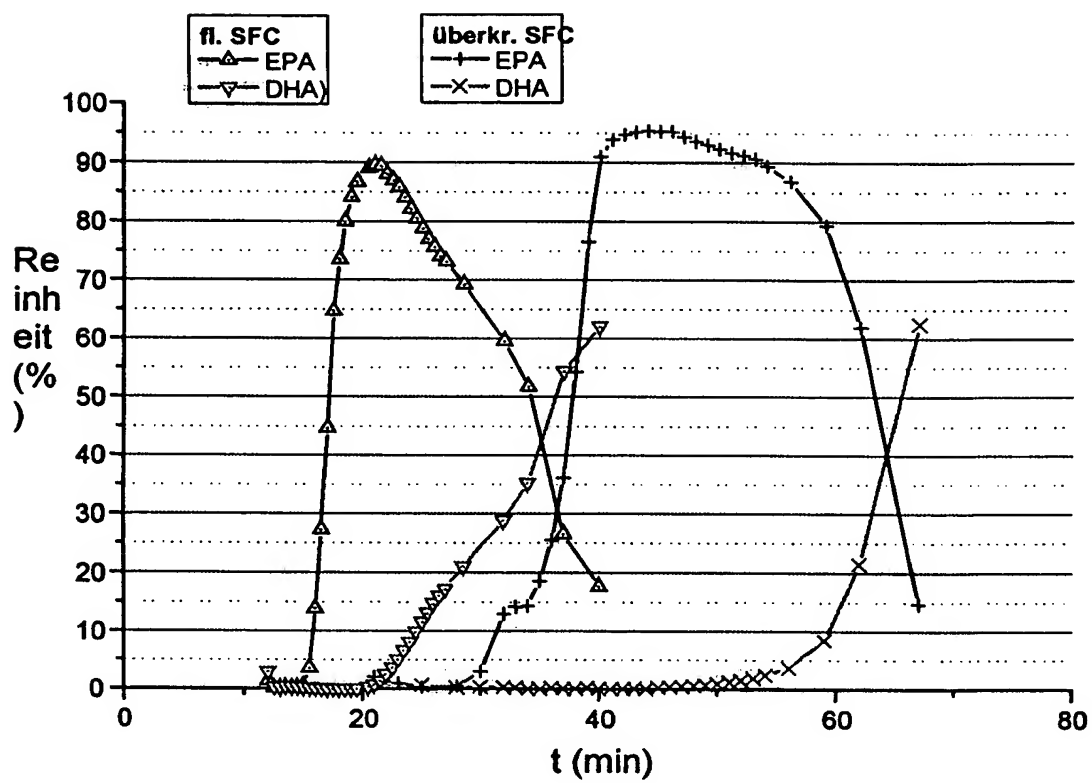
Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein säulenchromatographisches Trennverfahren im Rahmen einer Flüssigkeitschromatographie mittels Eluenten als mobile Phase
5 enthaltend niedere Moleküle, vorzugsweise Kohlendioxid, zur Isolierung und/oder Reinigung und/oder präparativen Gewinnung von (Natur)Stoffgemischen.

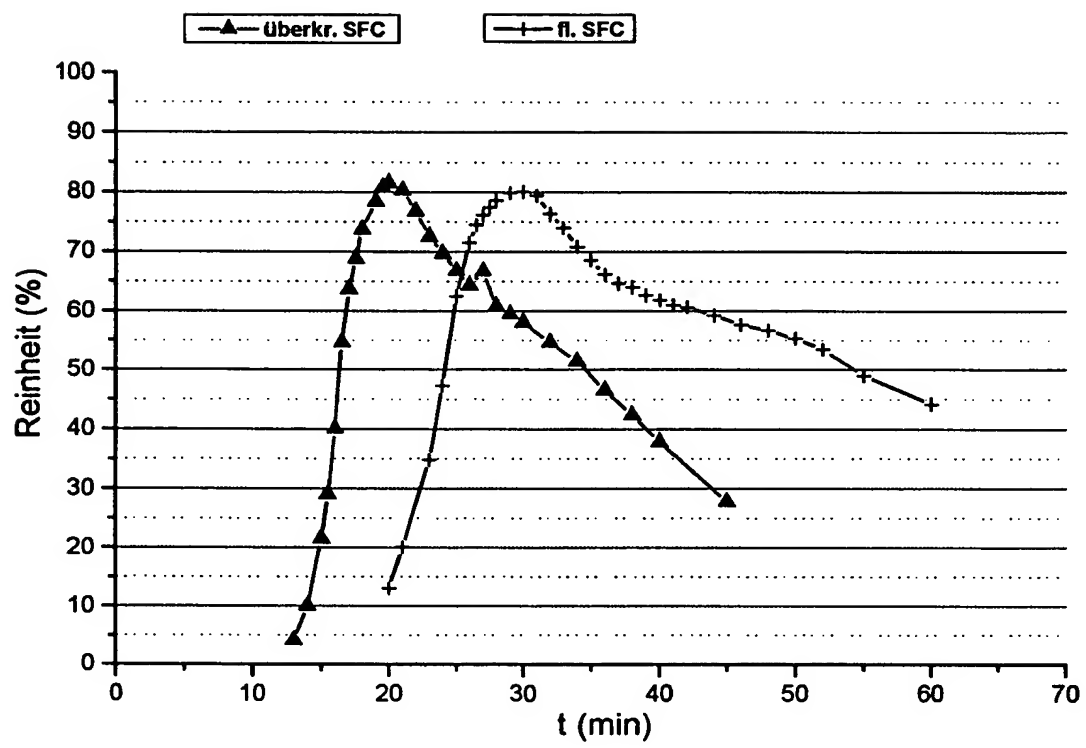
Figur 1.



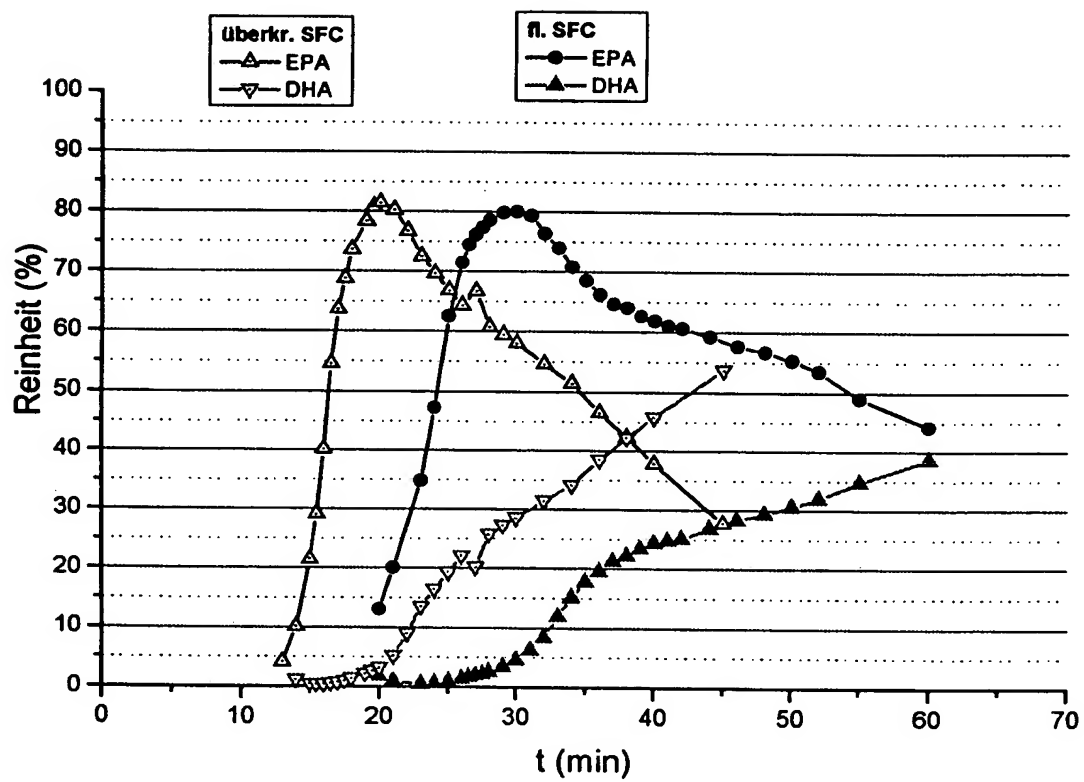
Figur 2:



Figur 3:

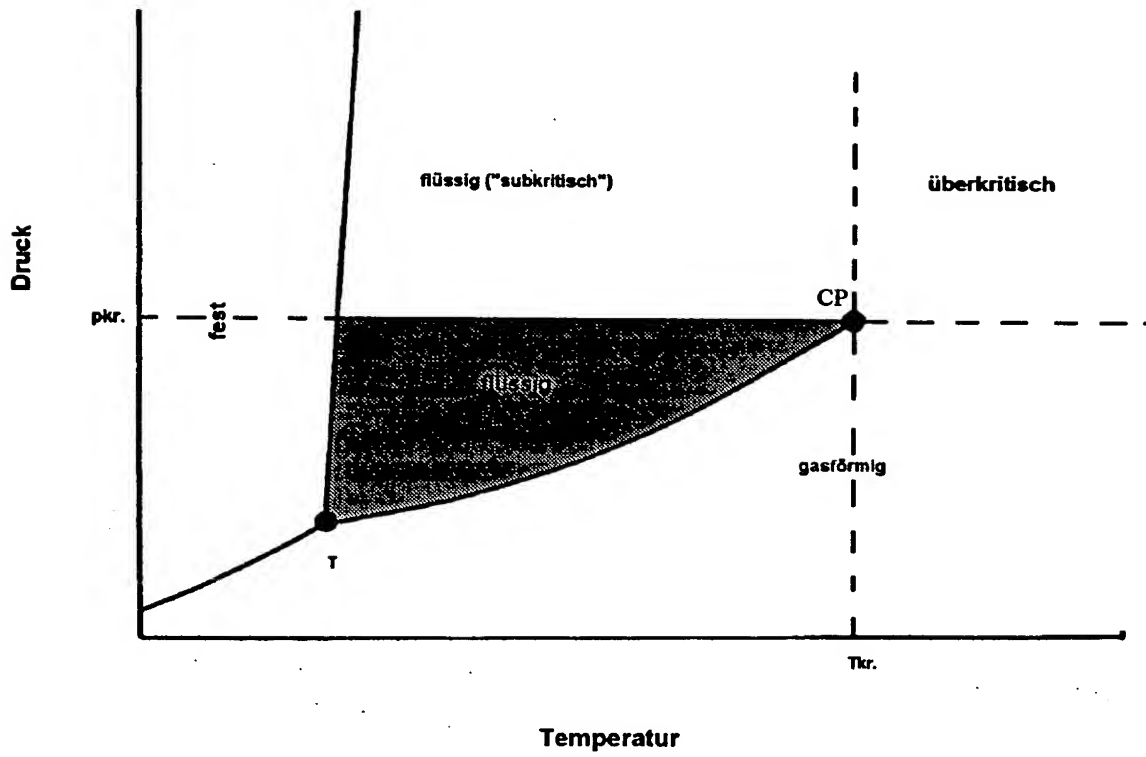


Figur 4.

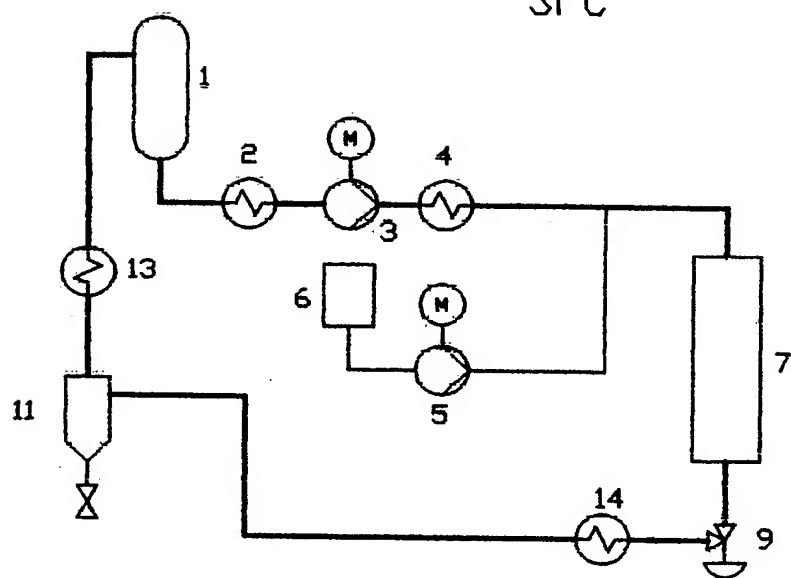


Figur 5:

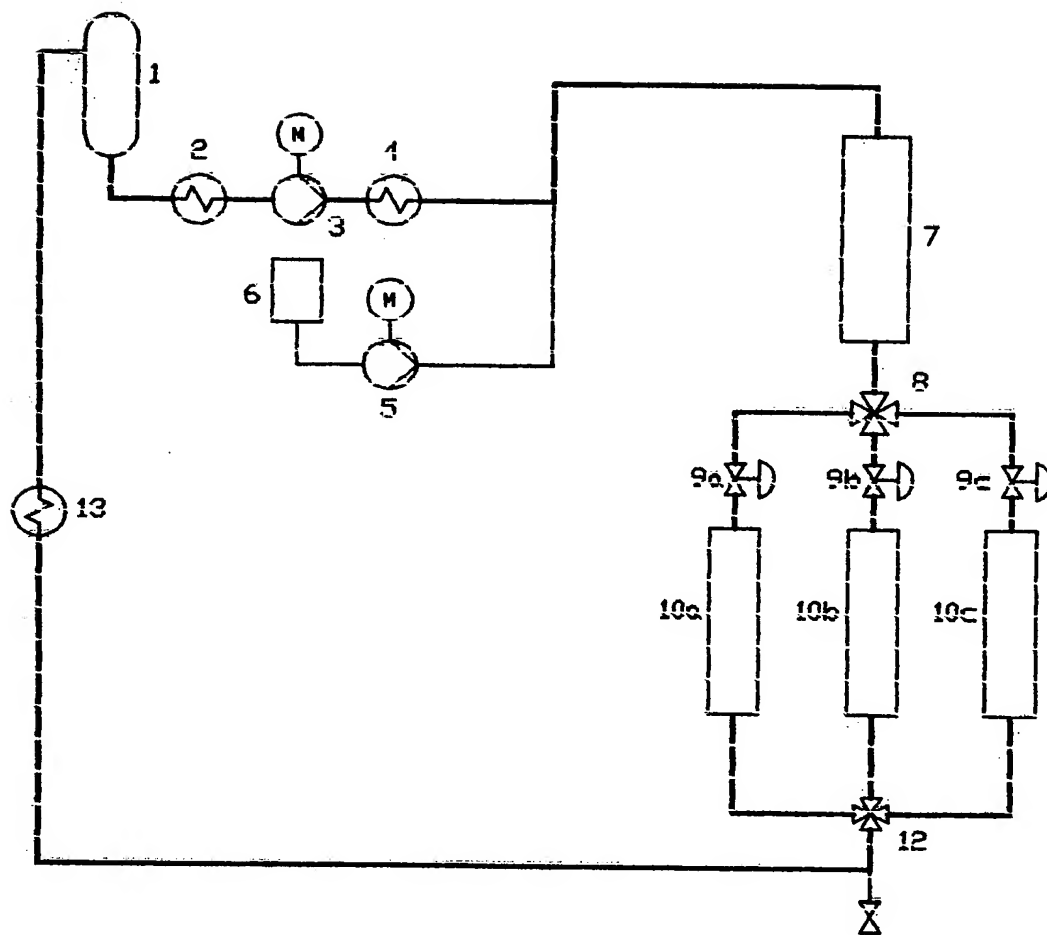
CP (Critical Point): $T_{kr.}=31,3^{\circ}\text{C}$; $p_{kr.}=73,7\text{ bar}$
Tripelpunkt: $T=-57^{\circ}\text{C}$; $p=5,2\text{ bar}$



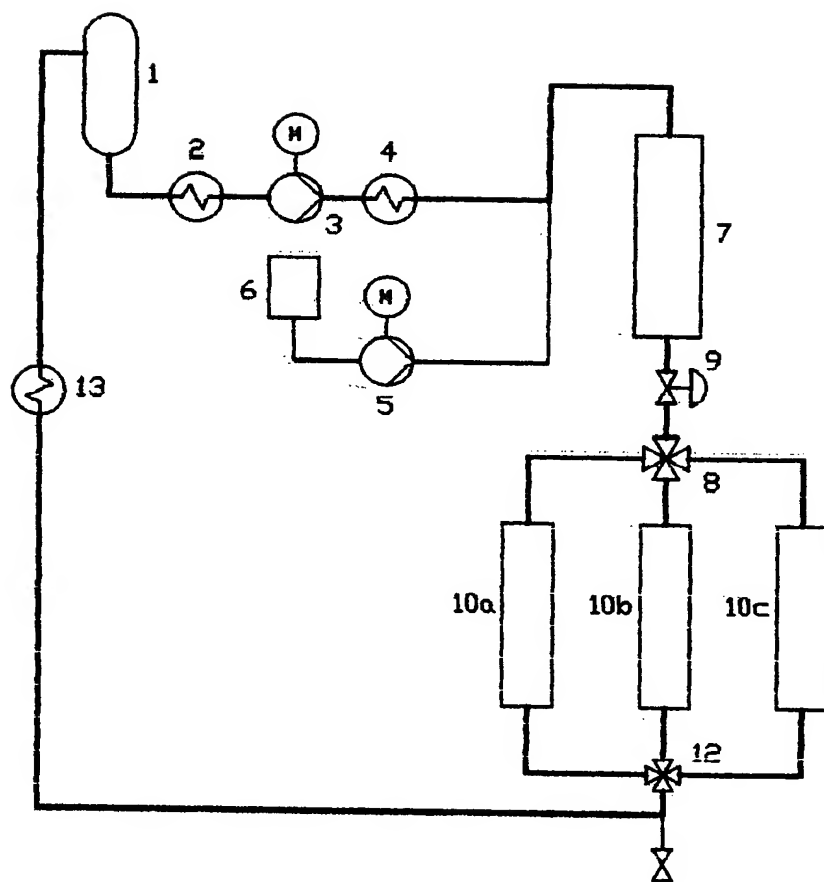
Figur Nr. 6
SFC



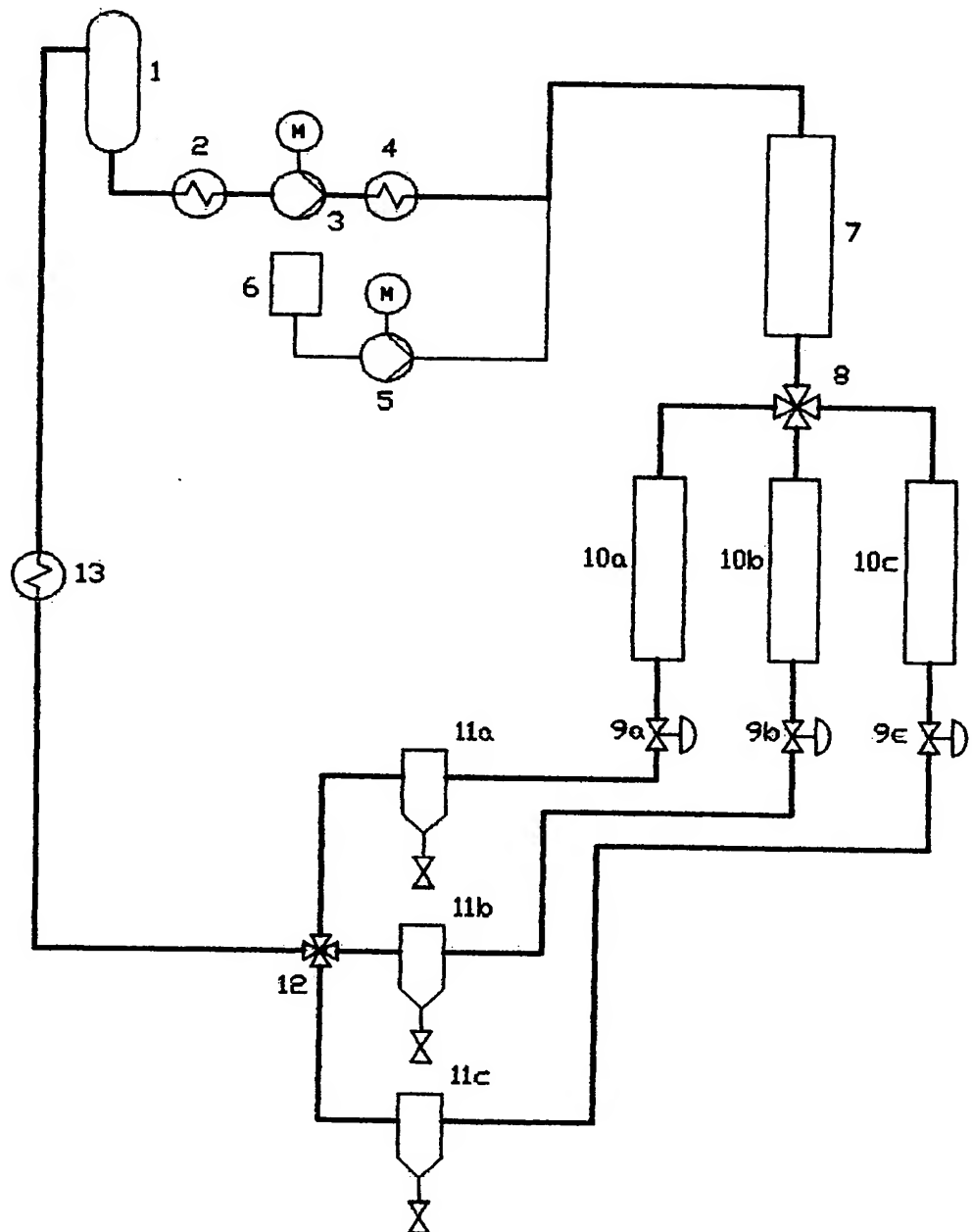
Figur Nr. 7



Figur Nr. 8



Figur Nr. 9



Zusammenfassung

